

ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE D'ALFORT

Année 1935

N°

52

THÈSE

POUR LE

DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

(DIPLOME D'ÉTAT)

Soutenue devant la Faculté de Médecine de Paris en 1935

PAR

Jean DOMERCQ

Né le 19 mars 1910, à Bordeaux (Gironde)

De l'Extraction alcool-éthérée des Lipides du Sérum sanguin de Cheval

Essai dans différents états pathologiques
et plus particulièrement dans l'anémie infectieuse

Jury :

Président : M. FIESSINGER, Professeur à la Faculté de Médecine de Paris.

Membres { M. PANISSET }
 { M. ROBIN } Professeurs à l'École Vétérinaire d'Alfort.

PARIS

IMPRIMERIE DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE

JOUVE & C^{ie}, ÉDITEURS

15, RUE RACINE, 15

1935

ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE D'ALFORT

Année 1935

N°

THÈSE

POUR LE

DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

(DIPLÔME D'ÉTAT)

Soutenue devant la Faculté de Médecine de Paris en 1935

PAR

Jean DOMERCQ

Né le 19 mars 1910, à Bordeaux (Gironde)

De l'Extraction alcool-étherée des Lipides du Sérum sanguin de Cheval

Essai dans différents états pathologiques
et plus particulièrement dans l'anémie infectieuse

Jury :

Président : M. FIESSINGER, Professeur à la Faculté de Médecine de Paris.

Membres { M. PANISSET }
 { M. ROBIN } Professeurs à l'École Vétérinaire d'Alfort.

PARIS

IMPRIMERIE DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE

JOUVE & C^{ie}, ÉDITEURS

15, RUE RACINE, 15

1935

Personnel enseignant de l'École Vétérinaire d'Alfort

Directeur honoraire : M. H. VALLÉE, Inspecteur général honoraire
des Services vétérinaires.

Professeurs honoraires : MM. G. BARRIER, Inspecteur général honoraire
des Ecoles Vétérinaires, H. VALLÉE, G. PETIT.

DIRECTEUR

M. C. BRESSOU, directeur de l'Institut de Médecine vétérinaire exotique.

PROFESSEURS ET CHARGÉS DE COURS

CHAIRES

MM.

- | | |
|---|--------------|
| 1 ^o Physique, Chimie et Toxicologie. Pharmacie. Inspection
du lait. | N... |
| 2 ^o Anatomie descriptive, systématique, topographique et
appliquée des animaux domestiques. Tératologie. . . . | BRESSOU. |
| 3 ^o Physiologie. Thérapeutique générale. | MAIGNON. |
| 4 ^o Agronomie et hygiène. Botanique et aliments du bétail.
Matière médicale | SIMONNET. |
| 5 ^o Anatomie pathologique. Histologie. Embryologie. Indus-
trie et contrôle des autres produits animaux. | VERGE. |
| 6 ^o Parasitologie et maladies parasitaires. Dermatologie et sé-
méiologie de la peau. Zoologie appliquée. Clinique des
maladies parasitaires et dermatologiques. | HENRY. |
| 7 ^o Pathologie médicale, séméiologie et propédeutique. Juris-
prudence vétérinaire. Médecine légale. Déontologie. Cli-
nique médicale | ROBIN. |
| 8 ^o Pathologie chirurgicale. Séméiologie. Médecine opératoire
et ferrure. Clinique chirurgicale | COQUOT. |
| 9 ^o Pathologie bovine, ovine, caprine et porcine. Maladies des
animaux de basse-cour. Séméiologie. Médecine opéra-
toire. Obstétrique. Clinique spéciale | LESBOUYRIÈS. |
| 10 ^o Pathologie générale. Maladies microbiennes et police
sanitaire. Microbiologie. Clinique spéciale. | PANISSET. |
| 11 ^o Zootechnie et appréciation des animaux domestiques.
Economie rurale | LETARD. |

AGRÉGÉS ET CHEFS DE TRAVAUX

MM. BERTHELON, BRION, CARPENTIER, GORET, MONVOISIN, MOUSSU, VALADE.

AGRÉGÉS CHARGÉS D'ENSEIGNEMENT

MM. CORDIER et THIEULIN.

La Faculté de Médecine et l'École Vétérinaire déclarent que les opinions émises
dans les dissertations qui leur sont présentées, doivent être considérées comme
propres à leurs auteurs et qu'elles n'entendent leur donner ni approbation, ni
improbation.



A MES CHERS PARENTS

A MON FRÈRE

A MA SOEUR

A M. LE PROFESSEUR FIESSINGER

Professeur de Pathologie expérimentale et comparée
Médecin de l'Hôpital Necker

*Qui a bien voulu nous faire le grand
honneur d'accepter la présidence de cette
thèse.*

A M. LE PROFESSEUR PANISSET

En témoignage de respectueuse reconnaissance pour l'accueil qu'il nous a réservé dans son laboratoire.

A M. LE PROFESSEUR ROBIN

*Hommage tres respectueux.
Témoignage de notre vive gratitude.*

A M. GORET

*Qui nous a inspiré le sujet de cette thèse
et nous a guidé de ses précieux conseils.
En témoignage de notre affectueuse
reconnaissance.*

A MES MAITRES DE L'ÉCOLE D'ALFORT

De l'Extraction alcool-étherée des Lipides du Sérum sanguin de Cheval

CHAPITRE PREMIER

Etude des protéides et des lipides du sérum.

La synthèse de l'urée, par WÆHLER, a porté le premier coup au vitalisme qui considérait les matières organiques comme des corps ne pouvant se former que dans l'être vivant, et grâce à une intervention divine ou à une forme d'énergie propre à la matière vivante.

Due au hasard, la synthèse de l'urée a permis depuis lors, l'étude physico-chimique de la constitution de la matière vivante.

Cependant, l'instabilité de la structure physico-chimique du protoplasme rend cette étude difficile, les méthodes chimiques classiques étant trop brutales pour cette analyse.

Les cellules vivantes, à l'intérieur desquelles évoluent les processus physico-chimiques auxquels sont liées les manifestations vitales, ont une structure homogène, que les réactifs précipitants, agissant

lors de la mort du protoplasma, déforment à nos yeux en alvéoles, réseaux, etc...

Cependant, dans la masse homogène du protoplasma, on distingue de petites gouttelettes (*noyau, plastes, mitochondries*) qui jouent un rôle bien déterminé dans la vie de la cellule. De plus, la cellule est douée d'un dynamisme caractérisant la vie : *elle s'accroît, se reproduit, et est animée de mouvements spontanés.*

Parmi les constituants de la matière vivante : protéïdes, glucides, lipides, les premiers nommés, d'une grande complexité de structure, formant très facilement des gels, subissant à la moindre variation des conditions extérieures de profonds changements chimiques, forment cependant avec des corps plus simples des complexes souvent stables et bien caractérisés : hétéroprotéïdes.

D'autres complexes, formés avec les lipides par exemple, sont moins connus bien qu'ayant un très gros intérêt au point de vue biologique.

A. — Protéïdes du sérum. Fractionnement.

Ils se trouvent sous forme de mélanges fort complexes que la dislocation hydrolytique ne pourrait pas dissocier nettement.

a) RÉSULTATS OBTENUS PAR LES MÉTHODES PHYSIQUES D'INSOLUBILISATION FRACTIONNÉE.

1. — Pour obtenir une séparation des protéïdes, on recourut d'abord aux caractères de solubilité. On

étudia les conditions dans lesquelles apparaissent les précipités dans le mélange des protéides en solution du sérum sanguin.

Précipitation simple dans H^2O . — PANUM [1] a, le premier, sans doute, précisé l'existence de deux grands groupes dans les protéides du sérum :

- 1^o Ceux précipitant par dilution simple ou accompagnée d'une légère acidification ;
- 2^o Ceux restant en solution dans ces conditions.

ALEX. SCHMIDT [2] nomma la première des deux fractions : *globuline*. Il remarqua leur précipitabilité par le chlorure de sodium à saturation.

HAMMARSTEN [3] critiqua ces travaux de fractionnement des protéides du sérum. Solubilité ou insolubilité dans l'eau distillée sont des différenciations mal choisies, les différentes fractions précipitées pendant la dialyse pouvant être une fois solubles, une autre fois insolubles dans H^2O ; ces qualités dépendent pour lui de la présence d'impuretés. En effet, le lécithide entraîné par les globulines expliquerait l'insolubilité de ces dernières.

Précipitation par le sulfate d'ammonium en solution. — HOFMEISTER [4] précipita les protéides du sérum par le *sulfate d'ammonium* à saturation, en considérant les quantités précipitées en fonction de la concentration.

KAUDER [5] montra que cette précipitation ne modifiait pas sensiblement les protéides du sérum et que la concentration critique où la précipitation

d'une première fraction est complète, se trouve autour de la demi-saturation. La fraction précipitant à demi-saturation fut nommée *globuline*, celle ne précipitant qu'à saturation complète étant l'*albumine*.

Hammersten, continuant la critique des définitions de *Panum* par solubilité et insolubilité dans l'eau distillée, montra que le sulfate de magnésium à saturation précipitait les globulines comme le sulfate d'ammonium à demi-saturation, d'où sa définition :

1^o pour les globulines : précipitabilité par sulfate d'ammonium à demi-saturation ; par sulfate de magnésium à saturation.

2^o Pour les albumines : précipitabilité par sulfate d'ammonium à saturation.

Globulines. — La fraction précipitée par dialyse directe du sérum étant moins abondante que celle précipitée par dialyse des globulines obtenues par précipitation par le sulfate de magnésium à saturation complète, les globulines de *Panum* et d'*Alex. Schmidt* ne constituent donc qu'une fraction des globulines d'*Hofmeister*. La fraction insoluble dans l'eau distillée d'*Hofmeister* que *Marcus Emil* et *Hammarsten* ne différencient ni par une température de coagulation, ni par un pouvoir rotatoire différents de la globuline d'*Alex. Schmidt* a été désignée sous le nom d'*euglobuline* par *MARCUS EMIL* [6]. La partie soluble dans l'eau distillée ou *globuline* d'*Alex. Schmidt* fut nommée *pseudoglobuline*.

L'étude immunologique de W. SENG [7], sur le sérum antidiphthérique, montra le bien-fondé de ce fractionnement des globulines, les anti-corps restant avec la pseudoglobuline.

Albumines. — GUERBER [8] réussit la cristallisation de 40 % de l'albumine du sérum de cheval par la méthode de *Hofmeister* ; ce mauvais rendement fut attribué par ROBERTSON [9] à l'existence d'une albumine amorphe avec une albumine cristallisable.

HALLIBURTON [10] trouva trois fractions d'albumine présentant des températures de coagulation différentes. Mais OPPENHEIMER [11] trouva et HUGARDY [12] ne trouva pas deux fractions qui précipitent par le sulfate d'ammonium entre des limites différentes de concentration.

La température de coagulation étant une mauvaise constante, le rendement d'une cristallisation dépendant de trop nombreuses conditions et les limites de précipitation peu nettes à une certaine concentration saline restant problématiques, le problème du fractionnement des albumines restait sans solution.

Comme résultat certain de ces travaux, on peut conclure à l'existence de deux types bien différenciés de protéides : les globulines et les albumines.

La différenciation des fractions de globulines et d'albumines est moins certaine.

2. *Recherche du point isoélectrique.* — La recherche du point isoélectrique des différentes protéides n'a

pu que confirmer la différence qui existait entre globuline (pH 6) et albumine (pH 4,8).

b) RÉSULTATS OBTENUS PAR L'ANALYSE CHIMIQUE
DES DIVERSES FRACTIONS D'ALBUMINE
ET DE GLOBULINE DU SÉRUM.

1. *Analyse élémentaire.* — Bien que n'étant guère applicable à des corps aussi complexes que les protéides, cette méthode a donné des formules un peu différentes, surtout quant au soufre, pour les albumines et les globulines.

HAMMARSTEN [13], pour du sérum de cheval, donne :

	C %	N %	N %	O %	S %
Globuline.....	52,71	7,01	15,85	22,32	1,11
Albumine.....	53,08	7,10	15,93	21,86	1,90

2. *Dosage des acides aminés.* — Albumine et globuline se comportent différemment, par exemple, la première ne contient pas de glyocolle tandis que la seconde en contient.

3. *Formoltitration.* — F. OBERMAYER et R. WILHEIM [14] ont étudié la formoltitration des globulines et des albumines du sérum sanguin. Ils mesurèrent le rapport de l'azote total obtenu par la méthode de Kjeldahl à l'azote formol titrable. Ce rapport, ou index aminique, varie comme l'inverse de la proportion de groupements aminés libres dans les molécules ; il varie d'ailleurs très fortement dans

une espèce et même chez un seul individu, pour des prises de sang différentes.

Ces deux auteurs procédèrent ensuite au fractionnement des albumines et des globulines entre des limites de concentration différentes en sulfate d'ammonium, et étudièrent chaque fraction ainsi obtenue, soit sept : La fibrinoglobuline, pas bien définie, deux fractions euglobuliniques, les deux fractions pseudoglobuliniques de *PORGES* et *SPIRO* [15], les deux fractions albuminiques d'*Oppenheimer*. L'index aminique diminuant d'une fraction à la suivante, les fractions les moins précipitables contiennent donc le plus de groupements aminés libres.

Tous ces travaux montrent qu'albumines et globulines sont des mélanges complexes de protéides naturels nombreux.

Des dosages chimiques et des mesures physiques sur les bandes d'absorption dans l'ultra-violet (*GROH* et *FALTIN*) [16], des dosages des acides aminés dans les différentes fractions albuminiques (*GOLDSCHMIDT* et *KAHN*) [17] ont donné des résultats comparables à ceux obtenus par la formol-titration.

c) TRAVAUX DE *SÆRENSEN*.

A la suite de travaux sur l'albumine de l'œuf, *SÆRENSEN* [18] considéra cette ovalbumine comme une espèce chimique à constante de solubilité bien caractérisée.

SÆRENSSEN [19] admit comme *Hofmeister* l'existence d'euglobuline insoluble et de pseudo-globuline soluble dans l'eau distillée.

Il fractionna l'une par dialyse suivie de dissolution en solution saline et précipitation par dilution et acidification, l'autre, par précipitation fractionnée par le sulfate d'ammonium à différentes concentrations. Il constata pour les fractions globuliniques :

- 1^o en mettant des quantités variables de globulines de la même fraction en excès, en présence de la même quantité du même solvant bien défini, que *la solubilité augmentait avec la quantité de globulines* ; ce fait fut retrouvé pour toutes les fractions (HARDY et MELLANBY [20] avaient constaté les faits) ;
- 2^o en remettant en solution dans un solvant salin les euglobulines précipitées par dialyse pour les précipiter à nouveau, et en répétant l'opération plusieurs fois, qu'une *quantité plus ou moins forte de protéides reste toujours en solution*, semblant prendre naissance à partir de fractions insolubles (H. CHICK [21] l'avait aussi constaté).

Le même fait fut retrouvé pour tous les protéides naturels étudiés par l'école de Sørensen, même pour l'ovalbumine.

Trois séries de substances furent obtenues par fractionnement à partir de l'albumine du sérum de cheval et elles présentèrent des précipitabilités et

des teneurs en acides aminées différentes ; leurs solubilités bien différentes aussi dépendaient de la quantité de protéides mise en présence du solvant.

d) TRAVAUX DE THE SVEDBERG [22].

Avec ses collaborateurs, il étudia par la méthode d'ultracentrifugation le poids moléculaire des protéides naturels et surtout de ceux du sérum. Des *poids moléculaires uniques* caractérisent ces protéides, mais les précipitations et les dissolutions les divisent en substances de poids moléculaires différents, que la dialyse et le mélange ne ramènent pas au poids moléculaire unique du début.

e) RÉSUMÉ.

De tous ces travaux, il résulte qu'*albumines et globulines* ne sont que des *mélanges complexes de nombreuses espèces chimiques* formant des *systèmes très labiles* évoluant facilement sous l'influence des variations thermodynamiques ou des *variations de concentration* ; des poids moléculaires uniques les caractérisent à l'origine, mais des espèces chimiques différentes peuvent avoir le même poids moléculaire (zones critiques de concentration très nettes séparant par précipitation des fractions complexes).

Pour *Sørensen*, des acides aminés, réunis en chaînes polypeptidiques par des forces de valence primaire, formeraient des espèces chimiques élémentaires réunies à leur tour par des forces de va-

lence secondaire en des sortes de polymères que ces mêmes forces secondaires lieraient entre eux ou avec *des groupements phosphorés ou des lipides* ; ainsi seraient constitués les complexes globulines et albumines.

B. — Lipides du sérum.

a) GRAISSES DE LA MATIÈRE VIVANTE.

Les graisses de la matière vivante se trouvent dans un état particulier que des travaux histologiques et chimiques ont décelé :

1. *Travaux histologiques.* — La plupart des lipides des tissus vivants ne prennent pas directement les colorants ; ils se trouvent donc dans les tissus sous une forme cachée à leurs réactifs histochimiques habituels.

Les substances lipoïdiques, colorées par des méthodes spéciales, donnent au tissu vivant qui les contient une coloration pâle, diffuse. La mort des tissus amène une coloration intense des granules lipoïdiques ; il y aurait une fragmentation irréversible des complexes lipoprotéïdiques avec mise en liberté des lipides (LEPESCHKIN) [23]. Il y aurait pour M. LUMIÈRE [24], un déséquilibre des colloïdes protoplasmiques.

Même après la mort, la majorité des graisses des tissus n'est pas colorable. Seul, un mordantage par le formol, les solutions salines concentrées et sur-

tout la trypsine ou la pepsine permet l'apparition des lipoïdes ou lipophanêrore.

Mais les lipides des tissus vivants ne sont pas seulement masqués à leurs colorants, mais aussi à leurs solvants. HOPPE-SEYLER [25] le démontra un des premiers, et le traitement à l'alcool chaud, avant l'emploi de l'éther, permet seul l'extraction des lipides des tissus.

2. *Travaux chimiques.* — ERLANDSEN [26] obtint une substance spéciale par traitement à l'éther du myocarde desséché, et ensuite du même myocarde, des quantités considérables de lécithides par traitement à l'alcool-éther. Il y aurait selon lui, et aussi selon *Hoppe Seyler* et LIEBERMANN [27], une combinaison chimique des protéïdes musculaires et de ces lécithides inextractibles par l'éther.

Etudes sur les émulsions de graisses dans l'eau. — L'effet émulsionnant serait dû, d'après LANGMUIR [28] et HARKINS [29], à une diminution de la tension superficielle alliée à un effet lié à la constitution des molécules stabilisant l'émulsion, effet qui serait la dissymétrie du champ énergétique de ces molécules, qui auraient elles-mêmes une structure linéaire avec des affinités différentes aux deux extrémités de cette ligne.

DEGKWITZ [30] appliqua la théorie de *Langmuir Harkins* à la matière vivante. Il démontra avec SEIFRITZ [31], HARKINS et HUMPHREY [32], SPRANGER, FERNBACHER [33], que le renversement

des phases est dû à l'antagonisme entre les stérols et stérides hydrophobes et les lécithides et protéides hydrophiles, de même que (BANCROFT) [34] le remplacement de la phase dispersante eau par une phase dispersante graisse est dû à l'action de savons à cation plurivalent, antagonistes des savons à cation monovalent.

L'antagonisme de l'ion sodium, excitant le système nerveux, et de l'ion calcium, calmant, est du même ordre.

L'antagonisme lipoidique ou des colloïdes hydrophiles et hydrophobes se ramènerait à l'antagonisme *in vitro* et *in vivo* des lécithides et protéides et des stérols et esters. Mais cette théorie reste peu probable, l'existence d'une couche monomoléculaire orientée de protéides n'étant qu'une hypothèse, de même que l'existence d'une phase lipidique dispersante.

D'après B. HANSTEEN-CRANNER [35] et V. GRAFE [36], les lipides de la matière vivante seraient dans un état physico-chimique spécial leur permettant d'être solubles dans l'eau, état spécial qui disparaîtrait lors de la mort.

b) ETUDE DES LIPIDES DU SÉRUM.

Les recherches effectuées sur les tissus solides ont pu avoir leurs résultats faussés ou déformés par la présence de squelettes semi-solides de protéides et de polyosides des cellules mortes ; aussi le sérum sanguin est-il le milieu idéal pour ces recherches.

1. *Caractères physico-chimiques des lipides du sérum.* — L'ultramicroscope est incapable de déceler une discontinuité dans la solution homogène qu'est le sérum sanguin qui contient pourtant de 3 à 8 ‰ de lipides (cholestérides, phosphatides, glycérides, traces de cholestérol libre) solubles dans l'éther et insolubles dans l'eau. Mais ces lipides ne sont pas extractibles par l'éther seul, et ils forment une solution homogène dans l'eau.

2. *Recherches sur les protéides intéressant les lipides.* — HOPPE-SEYLER et ARONHEIM [37] ont isolé du sérum une globuline contenant du phosphore extractible par l'alcool-éther, donc du lécithide.

HARDY [20] et HASLAM [38] trouvent que les euglobulines contiennent du phosphore, dont une partie sous forme de lécithide ; la pseudoglobuline n'en contiendrait pas. Pour HANDOWSKY et WAGNER [39], et pour H. CHICK [21], l'euglobuline serait formée par la réunion du lécithide avec la pseudoglobuline.

La majorité des stérols du sérum est entraînée en précipitation réversible avec les protéides (A. THEORELL et T. HUGO) [40].

TRØNSEGAARD et KOUDAHL [41] n'ont extrait que (0,02 gr. par litre) des traces d'un mélange de cholestérol et de phosphatides à partir des globulines, mais une quantité considérable (1 gr. par litre).

d'un mélange de cholestérol (0 gr. 66) et de lécithides (0 gr. 33) à partir des albumines.

Mais J. A. GARDNER et GAINSTOROUGH [42] ont trouvé que 20 % des stérols sont unis très énergiquement aux euglobulines.

L'étude du pouvoir rotatoire des protéides exigeait des protéides non dénaturés, dépourvus de graisse ; HARDY et GARDINER [43] les obtinrent par l'action combinée prolongée à froid de l'alcool absolu et de l'éther anhydre : la presque totalité des lipides du sérum fut ainsi extraite.

Sørensen reprit cette méthode et montra que les différences de solubilité des fractions des protéides du sérum n'étaient pas dues aux lipides.

3. *Recherches sur les lipides du sérum.* — GARDNER et GAINSTOROUGH [42] avaient constaté que la majorité des lipides restaient en solution lorsque l'on précipitait les globulines par le sulfate d'ammonium à demi-saturation. De cette constatation, M. A. MACHEBŒUF [44] fit le point de départ de ses travaux sur les lipides du sérum. Il trouva que la totalité des albumines et la presque totalité des lipides précipitaient à pH 3,8 en présence d'un excès de sulfate d'ammonium ; albumines et lipides redissous à la neutralité furent acidifiés à pH 3,7 ou 3,8 ; un nouveau précipité apparut qu'il traita de même et il répéta sept fois l'opération : le rendement des eaux-mères diminua peu à peu et le précipité obtenu arriva à avoir une teneur constante en phosphore,

cholestérol, acides gras et protéides dont presque 50 % de son poids de lipides. Malgré cela, ce précipité était très soluble dans l'eau.

Le complexe de Machebœuf a donc des proportions invariables de protéides et de lipides.

Ce complexe préexistait-il dans l'albumine du sérum ? ou bien a-t-il été libéré par le fractionnement à pH 3,8 ? En effet, au-dessous de pH 4 et au-dessus de pH 9, les protéides du sérum subissent une fragmentation réversible. La nature de ce complexe est encore un problème non encore résolu.

M. A. MACHEBŒUF, avec R. WAHL et G. SANDOR [45], a étudié le cas du sérum sanguin humain normal et pathologique.

Ces auteurs constatèrent que, comme pour le sérum de cheval, presque toutes les graisses précipitaient avec les protéides, que la teneur en lipides des diverses fractions protéidiques séparées par le sulfate d'ammonium était caractéristique, que la constitution de ces lipides pour chaque fraction était assez bien déterminée, et aussi que les variations du rapport lipides sur protéides pouvait caractériser certains états pathologiques. On aurait donc des systèmes lipo-protéidiques du sérum. M. A. MACHEBŒUF et G. SANDOR [46] montrèrent aussi que les protéides riches en lipides avaient un effet tampon plus considérable que celui des albumines pauvres en graisses.

M. A. MACHEBŒUF et R. WAHL [46] étudièrent

l'extraction éthérée prolongée du sérum : au bout de six mois, l'éther ne parvint à extraire que 50 % des lipides totaux, ce taux semblant d'ailleurs être une limite.

CHAPITRE SECOND

Etude du système lipoprotéidique du sérum.

A. — Système lipoprotéidique du sérum.

G. SANDOR [47] fit une étude physico-chimique serrée du système lipoprotéidique.

a) MÉTHODE EMPLOYÉE.

Pour le fractionnement des protéides, il employa la méthode de M. A. Machebœuf, méthode qu'il standardisa pour faciliter les opérations :

il ajouta 10 cmc. de solution saturée neutre de sulfate d'ammonium à 10 cmc. de sérum pour précipiter les globulines qui furent dissoutes dans 6 cmc.6 d'eau distillée et reprécipitées par un volume égal de solution saturée de sulfate d'ammonium ;

il obtint environ 27 à 28 cmc. d'eaux-mères auxquelles il ajouta 16 cmc. de solution saturée de sulfate d'ammonium et 6 cmc. d'acide sulfurique N/5 pour le sérum de cheval et 6 cmc. 5 pour le sérum de mouton ; au bout de 15 minutes, il sépara les albumines par centrifugation ;

il procéda ensuite à l'extraction des graisses des albumines et des globulines précipitées et recueillies par centrifugation ;

il fit se dissoudre les globulines intégralement dans le plus petit volume possible d'eau et fit de même pour les albumines en leur ajoutant quelques gouttes d'ammoniaque ;

il additionna les solutions obtenues d'un excès d'alcool à 96° (soit 4 à 5 fois le volume de la solution), les porta à ébullition au bain-marie pendant une demi-heure pour dénaturer les protéides ; le coagulum fut ensuite traité pendant 7 heures par de l'alcool bouillant, puis pendant deux heures par de l'éther bouillant. Il fit évaporer les solutions dans le vide, reprit le résidu par l'éther anhydre, filtra, plaça la solution dans une fiole de Fourneau tarée, évapora l'éther à basse température et maintint dans un dessiccateur jusqu'à poids constant (les poids des extraits donnent les teneurs en lipides des albumines et des globulines).

Les protéides coagulés et délipidés furent lavés à l'eau bouillante et maintenus dans une étuve à 110° jusqu'à poids constant. Un volume connu de sérum fut coagulé par un excès d'alcool à chaud et traité comme ci-dessus.

4 à 10 % seulement des graisses du sérum ne furent pas entraînées en précipitations réversibles avec les protéines. Rares furent les cas où une notable partie des lipides ne précipita pas avec les protéides.

b) TENEUR EN GRAISSES DES GLOBULINES ET DES
ALBUMINES.

Par la méthode décrite ci-dessus, G. Sandor obtint l'extrait lipoïdique des globulines et des albumines.

La teneur en graisses des globulines et des albumines varie fortement d'une espèce à l'autre ; elle varie aussi d'un individu à l'autre dans la même espèce.

Le rapport entre les lipides de l'albumine et les albumines est le chiffre le plus constant dans une espèce animale. Le rapport lipoprotéidique des globulines, varie par contre, fortement.

Pour l'homme, le cheval et le chien, le rapport lipoprotéidique des albumines est plus élevé que celui des globulines, les graisses du sérum précipitant surtout avec les albumines. Pour le mouton et le lapin, globulines et albumines se partagent les graisses plus également.

C'est un ensemble complexe de lipides qui précipitent avec les globulines et les albumines.

Phosphore et insaponifiable se partagent assez également entre globulines et albumines, et non l'un, insaponifiable, avec les globulines, et l'autre, phosphore, avec les albumines, comme le voudrait la théorie colloïdale.

c) TENEUR EN GRAISSES DES PRODUITS DE FRACTIONNEMENT DES GLOBULINES ET DES ALBUMINES.

1. *Le fractionnement des albumines* du sérum sanguin de cheval fait par *Machebœuf* donna naissance à un complexe lipoprotéidique bien déterminé contenant près de 50 % de son poids de lipides constitué de licithides et de cholestérides.

2. *Le fractionnement des globulines* en euglobulines et pseudo-globulines fut étudié en ses différentes méthodes par *Sandor*, qui compara les rendements de ces dernières en protéides et en lipides.

Méthode de PORGES et SPIRO [15]. — A un volume connu de sérum fut ajouté un volume moitié moindre d'une solution saturée neutre de sulfate d'ammonium ; le tout fut centrifugé au bout d'une demi-heure, les eaux-mères furent décantées, le précipité fut dissous dans un volume connu d'eau distillée et reprécipité par un demi-volume de sulfate d'ammonium saturé : ce précipité constitua les euglobulines de *Porges et Spiro*.

Aux eaux-mères fut ajouté le tiers de leur volume d'une solution saturée neutre de sulfate d'ammonium, le précipité fut redissous et reprécipité et il constitua les pseudo-globulines de *Porges et Spiro*.

La détermination en poids des protéides et des

graisses de ces précipités se fit par la méthode décrite au début de ce chapitre.

Méthode par dialyse. — Les globulines totales d'un sérum de cheval furent précipitées par le sulfate d'ammonium à demi-saturation, purifiées par quatre précipitations et dissolutions successives. Le précipité de globulines obtenu fut divisé, par dialyse contre de l'eau distillée, en euglobulines constituées par le précipité séparé par centrifugation et en pseudo-globulines contenues dans les eaux-mères de dialyse.

Les euglobulines et les pseudo-globulines obtenues par la méthode de Porges et Spiro contiennent à peu près la même proportion de lipides et leurs teneurs en graisses sont très variables.

Par dialyse, pseudo et euglobulines contiennent autant de graisses les unes que les autres. L'insolubilité des euglobulines dans l'eau ne saurait donc être mise sur le compte des graisses qu'elles contiennent, ce qui infirme la théorie de Hammarsten et Chick.

Fractionnement secondaire des euglobulines de dialyse. — L'euglobuline obtenue par dialyse, soit l'euglobuline A, fut dissoute dans une solution saline diluée et remise à dialyser jusqu'à disparition des sels.

Une nouvelle euglobuline B soluble prit ainsi naissance ainsi qu'une pseudo-globuline B. On obtint par le même processus, une euglobuline et une

pseudo-globuline C. L'euglobuline C obtenue était insoluble dans des solutions salines diluées et elle était constituée par une euglobuline C¹, blanche et pulvérulente et par une euglobuline C₂, jaune et visqueuse, plus riche en graisses.

Dans les grandes fractions : euglobulines, pseudo-globulines et albumines, également riches en graisses, la teneur en lipides n'intervient pas sur la solubilité. Ce n'est que dans les fractions secondaires qu'elle paraît jouer un rôle. Peut-être ce fait doit-il être attribué à un changement de structure physique des protéides au cours des fractionnements.

d) CONSTITUTION DES LIPIDES DES FRACTIONS PROTÉIDIQUES.

Les fractions lipoprotéidiques obtenues à partir du sérum contiennent toutes plusieurs genres de graisses en quantités appréciables. On n'a pas trouvé de fractions où les lécithides ou les cholestérides soient nettement prédominants.

Il faudra donc chercher une théorie physique pour l'explication de la nature des complexes que sont pseudo et euglobulines et albumines.

e) ETUDE DES PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES DU SYSTÈME LIPOPROTÉIDIQUE DU SÉRUM.

En l'absence de réactif, les lipides du sérum normal paraissent conserver leur état hydrosoluble presque indéfiniment.

Cet état hydrosoluble est d'une stabilité considérable vis-à-vis de l'éther. Une extraction de 24 heures n'extrait que 2 % des lipides du sérum.

L'extraction prolongée pendant six mois, ne donne que 50 % des graisses du sérum (Machebœuf et R. Wahl [45]). Et pourtant, le système lipoprotéidique du sérum est sans doute un système en faux équilibre.

Le réactif destructeur des liaisons lipoprotéidiques est une association alcool-éther. A froid, sans dénaturation des protéides, l'alcool déshydrate les protéides et l'éther extrait les lipides (méthode de Hardy et appareil de Soxhlet).

L'extraction, parfaite au point de vue quantitatif, n'est cependant obtenue qu'avec dénaturation des protéides, dans un appareil de Kumagawa, à chaud.

Après l'action de la pepsine sur le sérum, l'extraction éthérée n'a subi aucune augmentation, contrairement à ce qui se passe pour le tissu musculaire.

Conclusions sur ce qui précède.

Tout ce qui précède montre que des rapports étroits unissent les lipides aux protéides pour former un système lipoprotéidique.

Le partage des graisses entre les grandes fractions protéidiques se fait avec régularité et n'est pas le fait d'un simple entraînement par un précipité colloïdal. Les liaisons entre protéides et lipides dans

les précipités préexistent dans la solution primitive, le sérum.

Nous avons vu dans le premier chapitre, que les protéides sont des mélanges complexes où des polypeptides sont réunis par des forces sur la nature desquelles on discute encore.

Nous venons de voir dans le second chapitre que les rapports entre différents protéides sont connexes des rapports entre lipides et protéides, d'où l'importance de la question de la nature des rapports lipoprotéidiques.

B. — Etude de l'extraction des lipides du sérum sanguin par l'alcool-éther

(par M. A. MACHEBŒUF et G. SANDOR.) [48]

Nous avons vu que l'éther seul était incapable d'opérer l'extraction des lipides de la matière vivante, mais qu'allié à de petites quantités d'alcool il opérait très bien cette extraction. Dans la méthode de Hardy et de Gardiner, l'extraction presque quantitative des lipides s'effectue à froid si l'on épuise les protéides par de l'éther après les avoir déshydratés par de l'alcool à très basse température.

Si l'on ajoute de l'alcool en petite quantité à du sérum surmonté d'une couche d'éther, la phase éthérée se colore parfois rapidement en jaune, le sérum restant parfaitement limpide, les protéides n'étant pas dénaturés généralement.

Machebœuf et Sandor étudièrent quantitativement ce phénomène en déterminant les quantités de graisses extraites en fonction de la concentration en alcool, du temps et d'autres facteurs.

a) INFLUENCE DE LA CONCENTRATION D'ALCOOL
SUR LA QUANTITÉ DE LIPIDES EXTRAITS EN UN
TEMPS DONNÉ CONSTANT DE SIX HEURES.

Description de la méthode. — Dans une série de boules à décantation un volume bien déterminé de sérum et un volume égal d'éther furent mis, auxquels furent ajoutées des quantités croissantes d'alcool à 96°. Pour permettre l'action de l'alcool d'abord, et de l'éther ensuite sur le sérum, les boules à décantation furent agitées d'une façon identique et lentement pour éviter l'apparition d'émulsions pouvant résulter de l'action brutale de l'alcool sur les protéides du sérum. Le pourcentage d'alcool utilisé fut exprimé par rapport au volume du sérum.

Les émulsions de protéides apparaissant entre la phase aqueuse et la phase éthérée vers la concentration de 20 % d'alcool et empêchant toute séparation quantitative des deux phases, seules les concentrations inférieures à 20 % d'alcool furent utilisées.

Après six heures de contact entre l'éther et le sérum alcoolisé, la phase aqueuse fut soutirée ; la phase éthérée fut lavée à l'eau pour enlever l'alcool et les substances non lipidiques, placée dans des fioles de Fourneau tarées, évaporée à sec ; les rési-

du, après dessiccation jusqu'à poids constant dans le vide sulfurique, furent pesés.

Résultats obtenus en opérant sur 25 cme. de sérum du cheval n° 1 et 25 cme. d'éther en présence de quantités variables d'alcool à 96°, pendant 6 heures :

<i>Pourcentage d'alcool par</i>										
<i>rapport au sérum....</i>	0%	2%	4%	6%	8%	10%	12%	14%	20%	
<i>Milligrammes de graisses</i>										
<i>extraites</i>	1,5	1,6	2,7	3,2	75	74	75	25	42	

On voit que la quantité de graisses extraites varie avec la teneur en alcool, mais qu'elle est en fonction discontinue de cette teneur en alcool.

Il y a une région optimale d'extraction pour laquelle la quantité de graisses extraites est indépendante de la quantité d'alcool ajoutée.

La première discontinuité entre 6 et 8% est caractéristique et constante pour tous les sérums de chevaux ; il y a toujours un seuil de concentration alcoolique au-dessous duquel l'extraction ne se produit pas ou très mal.

Le point où la quantité de graisses extraites diminue pour une augmentation de la concentration d'alcool, soit le passage de 12 à 14% sur le tableau ci-dessus, n'est pas constant. On ne le trouve que pour certains chevaux, du moins pour les concentrations ne dépassant pas 20%.

Variations. — Le seuil d'extraction pour les chevaux normaux peut varier et n'est pas cantonné aux environs de 10%. Les quantités de graisses ex-

traites dans les conditions optimales ont varié pour les chevaux normaux de 20 à 100 mgr. pour 25 cmc. de sérum.

La proportion des lipides totaux extraits du sérum par l'éther varie autour de 50 % environ des lipides totaux du sérum ; mais il y a des variations individuelles considérables allant de 4 % à peine à 80 %. Le seuil d'extraction est toujours sensible.

Nature des graisses extraites. — Comme dans l'étude des lipides précipitant avec les diverses fractions protéidiques, on n'extrait pas exclusivement ou d'une façon prédominante une certaine espèce de lipides, mais un ensemble complexe de graisses qui a sensiblement la même constitution que les graisses totales du sérum.

La constitution des graisses reste sensiblement constante pour la région optimale d'extraction, mais pour les concentrations immédiatement supérieures à la zone optimale et au-dessous de 20 % d'alcool, les graisses extraites ont une constitution très différente, les lécithides n'étant plus extraits.

GRAISSES EXTRAITES LORSQUE LA CONCENTRATION EN ALCOL
EST A L'OPTIMUM.

	P. Lipidiques	Insaponifiables totaux	Acides gras totaux
	—	—	—
<i>Lipides totaux du sérum</i>	1 %	24 %	59 %
<i>Lipides extraits</i>	0,9 %	32 %	60 %

GRAISSES EXTRAITES AUX DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS EN ALCOOL.
CHEVAL N° 2.

Concentration en alcool	6 %	8 %	10 %	12 %	14 %
Mgr. extraits.	1,3	30	30	30	10
P. Lipidique %		0,9	0,8		0,2
Insaponifiables %		31	31		
Acides gras %		59	60		

Extraction pour 10 cmc. de sérum.

b) Y A-T-IL UN COEFFICIENT DE PARTAGE
ENTRE SÉRUM ET ÉTHER ?

Il serait absurde de supposer un coefficient de partage des graisses entre une phase aqueuse et une phase éthérée ; mais le sérum constitue une phase aqueuse particulière en raison de la grande quantité de protéides qu'il contient, protéides qui pourraient former une troisième phase au sein même du sérum.

Y aurait-il un coefficient de partage entre la phase éthérée et une phase protéidique possible ? Si oui, les lipides du sérum se trouveraient en dissolution dans les protéides sériques.

Pour vérifier cette hypothèse, G. Sandor conduisit ses expériences de deux façons différentes :

1. *Influence du volume d'éther sur la quantité de graisses extraites.* — Dans cette étude, l'on ignorait tout du coefficient de partage de l'alcool entre l'éther et le sérum. Lorsqu'on augmente le volume d'éther, en laissant constantes les quantités d'alcool et de sérum, la phase sérique s'appauvrit progressi-

vement en alcool. Cependant, il y a une région assez étendue des concentrations alcooliques où la quantité des graisses extraites reste constante. Comme le coefficient de partage doit être fortement en faveur de la phase aqueuse, si l'on part d'une concentration assez élevée dans la région optimale de l'extraction, pour des volumes d'éther assez différents, la concentration en alcool, tout en diminuant dans la phase aqueuse, doit rester dans les limites de la zone optimale. Si alors on observe une augmentation de la quantité extraite, on ne pourra attribuer ce fait qu'à l'existence d'un coefficient de partage des graisses entre le sérum et l'éther.

A un même volume de sérum, soit 20 cmc., furent ajoutées des quantités variables d'éther et une quantité constante d'alcool, 2 cmc., soit 10 %.

Concentration en alcool...	10%	10%	10%	10%
Volume éther.	10 cmc.	20 cmc.	35 cmc.	60 cmc.
Mgr. de graisses extraites..	63	61	62	4

Pour des volumes d'éther allant de 10 à 35 cmc., les quantités de graisses extraites sont restées constantes : il n'y a donc pas de coefficient de partage.

Pour 60 cmc. d'éther, la concentration alcoolique dans le sérum est tombée au-dessous de la limite inférieure de la zone optimale, et l'extraction ne s'est pas produite.

2. *Influence de la répétition des extractions.* — Comme pour plusieurs extractions successives par l'éther ce dernier extrait l'alcool du sérum, faisant

ainsi diminuer progressivement la concentration en alcool, l'auteur remédia à cette cause d'erreur en utilisant de l'éther chargé d'eau et d'alcool par agitation avec une phase aqueuse contenant de l'alcool à la concentration du sérum étudié.

30 cmc. du sérum de cheval furent extraits à quatre reprises par 30 cmc. d'éther, chaque extraction durant 24 heures et la concentration d'alcool à 96° correspondant à 10 % du volume du sérum :

Extractions.....	1 ^{re}	2 ^e	3 ^e	4 ^e
Mgr. de graisses extraites..	68,5	2,9	2	0,8

Les petites quantités extraites aux 2^e, 3^e et 4^e extractions semblant constituées surtout par un pigment, les graisses extraites le sont au cours de la première extraction.

Il n'y a donc pas de coefficient de partage entre sérum et éther pour les graisses extraites en présence d'alcool à faibles concentrations.

c) INFLUENCE DE LA DURÉE DE CONTACT ENTRE L'ÉTHER ET LE SÉRUM ALCOOLISÉ.

Cette étude fut effectuée en mettant dans une série de boules à décantation des quantités toujours les mêmes de sérum, d'éther et d'alcool, mais en effectuant la décantation après des contacts plus ou moins longs et des agitations tout à fait comparables pour toutes les boules. Les phénomènes constatés furent différents pour les concentrations rela-

tivement faibles en alcool ou inférieures à 14 %, et pour les concentrations plus fortes :

1. *Extraction en fonction du temps pour les concentrations relativement faibles en alcool.* — Les phénomènes observés ne furent pas identiques pour tous les sérums, mais comparables : pendant une phase préparatoire assez longue, la quantité de lipides extraits resta faible, et ensuite augmenta brusquement, atteignant très rapidement sa limite.

CHEVAL n° 3 (20 cmc. de sérum avec 10 % d'alcool). — Entonnoirs agités toutes les deux minutes pendant les sept premières heures.

Durée de contact..	15'	30'	45'	1 h.8'	1 h.30	2 h.	3 h.	48 h.
Mgr. de graisses extraites.	3,6	4,2	4,7	17,5	64,5	65	64	66

Pendant la phase préparatoire, qui a duré une heure environ, l'éther n'a extrait que 4,7 mgr. de graisses, alors que dans les 30 minutes suivantes, il en a extrait 60 mgr. Mais pendant les 48 heures suivantes, il n'en a pas plus extrait que pendant 1 h. 30. Tout ce qui devait être extrait l'a été pendant les trente minutes qui ont suivi la phase préparatoire.

La durée de la phase préparatoire peut varier très notablement d'un cheval à un autre ; elle varie aussi beaucoup avec la concentration alcoolique du sérum :

CHEVAL n° 4 (20 cmc. sérum). — Alcool à 6, 7, 8 et 10 %.

Agitation au moment du mélange et 15 minutes avant la décantation :

Concentrations en alcool		6%	7%	8%	10%
		Milligrammes de graisses extraits			
Durée de	1 h 30		0,9	1,1	1,2
contact de	2 h			1,1	
l'éther et du	3 h			1,4	
sérum alcoolisé	7 h			3,3	39,4
	9 h			19,8	
	12 h				42,0
	17 h	0,7	2,9		
	19 h		4,4		
	22 h		33,0		
	23 h		40,0	43,5	
	26 h	2,2	42,0		
	30 h			43,2	
	48 h	42,0		43,4	44,0
	54 h	42,0			

Les temps préparatoires augmentent lorsque la concentration alcoolique diminue. L'augmentation est surtout nette pour le passage de 8 à 7 % d'alcool, allant de 7 h. à 19 h.

Après la phase préparatoire, le système aboutit rapidement à un équilibre qui se manifeste par une limite des quantités de graisses extraites identique pour les diverses concentrations alcooliques (42 à 44 mgr.).

La durée de la phase active d'extraction est identique pour les différentes concentrations en alcool.

Donc, pour un même sérum, la durée des temps préparatoires est déterminée par les concentrations

alcooliques différentes, mais la durée de la période active d'extraction et la quantité de lipides extraits sont deux caractéristiques du sérum étudié et ne dépendent pas de la concentration en alcool.

2. *Extraction en fonction du temps pour les concentrations relativement élevées en alcool.* — Pour des concentrations en alcool supérieures à 12 % l'on constate que l'extraction est moins rapide, moins régulière et moins complète.

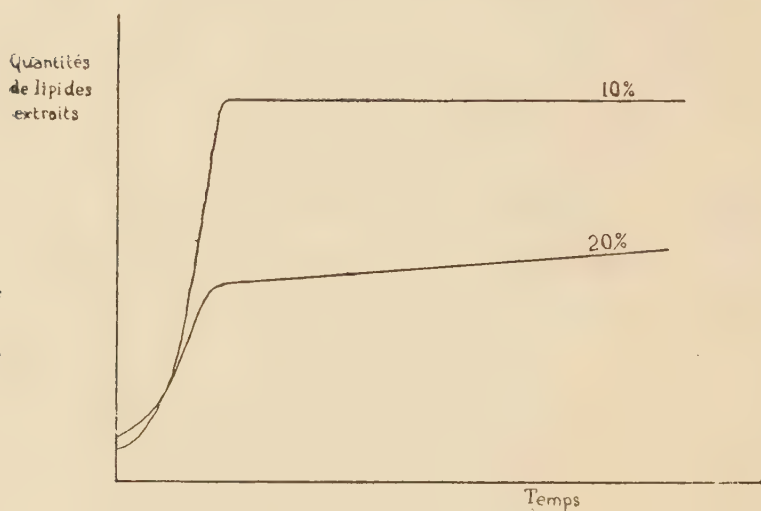
CHEVAL n° 3 (20 cmc. de sérum et 20% d'alcool) :

Temps	15'	45'	1 h.30	3 h.	5 h.	8 h.	48 h.
Mgr. extraits.....	6,1	8,1	32,0	38,0	42,0	34,0	56,0

L'extratibilité est diminuée, mais pas toujours

L'extraction se fait lentement et n'atteint pas de limite nette, même pour de très longs temps de contact. La phase préparatoire n'est pas nette comme pour les concentrations alcooliques plus faibles ; la phase d'extraction est brusque, mais la quantité de lipides extraite augmente encore après cette phase d'extraction : ce fait est sans doute dû à une dénaturation des protéides, dénaturation visible quand à ses effets sur l'apparence du sérum, opalescences et précipités se formant à la longue.

Courbes d'extraction à 10 et 20 % d'alcool :



*d) CHANGEMENTS DE VISCOSITÉ
ET D'ASPECT DU SÉRUM PENDANT L'EXTRACTION.*

1. *Etude des opalescences et des précipités qui se produisent aux diverses concentrations en alcool. —* Les opalescences qui se produisent pour certaines concentrations en alcool sont les signes précurseurs de la lipophanérose.

Elles sont en rapport avec la concentration en alcool mais aussi avec le temps écoulé depuis le début de l'expérience.

Dans le cas le plus général, une heure après la séparation des phases, du point de vue de l'aspect du sérum quatre régions peuvent être distinguées dans l'échelle des concentrations alcooliques ; ces

régions sont superposables aux régions d'extractibilité différentes :

Concentrations en alcool	0	2	6	8	10	12	14	20
M ^g s extraits	1,5	1,6	2,7	74,0	75,0	74,0	25,0	42,0
Aspect du sérum	Limp.	± Limp.	Opal.	Très limp.	Très limp.	Très limp.	Opal.	Opal.

L'extraction ne se produisant pas au-dessous de 6 %, le sérum reste limpide. A 6 %, concentration précédant le seuil d'extraction, le sérum est opalescent après sa séparation d'avec l'éther surnageant. Le sérum devient plus limpide qu'il ne l'était avant sa mise en présence d'éther pour les concentrations allant de 8 à 12 %. Pour 14 % et au-dessus, le sérum est déjà opalescent avant la décantation et, après celle-ci, il se forme des précipités de protéides.

Le point d'opalescence critique n'est pas tout à fait constant, mais il est toujours en relation avec le seuil d'extraction optimum.

Les faits se passent d'une autre manière pour les sérums autres que ceux du cheval.

2. *Etude des changements que subit l'aspect des sérums dans le temps, pendant l'extraction.* — En présence de 6 % de son volume d'alcool, le sérum subit une extraction dont la phase préparatoire est très longue et permet ainsi une étude assez détaillée.

Voici le résumé des constatations faites :

pendant la phase préparatoire à l'extraction, l'aspect des phases sériques passe par trois phases secondaires :

- a) si l'on sépare l'éther du sérum alcoolisé après un contact très court, la phase hydroalcoolique est limpide et le reste lorsque l'éther dissous s'évapore ;
- b) si l'on sépare les phases après une durée de contact plus longue, variable avec les sérums, ceux-ci sont opalescents et cet aspect persiste après évaporation de l'éther dissous ;
- c) si l'on sépare les phases après une durée de contact encore plus longue, mais pas assez pour produire l'extraction, l'opalescence du moment de la séparation des phases disparaît avec l'éther dissous qui s'évapore.

Si la séparation des phases s'effectue après l'extraction, le sérum reste limpide indéfiniment.

On voit que le système lipoprotéidique doit subir le mordantage de l'alcool-éther pour évoluer vers la lipophanérose.

Cheval n° 3 — 20^{me} de sérum à 10% d'alcool :

Durée d'extraction	15 minutes	45m	1 h. 8 m.	1 h. 30	8 h.	48 h.
Aspect immédiat après séparation	Opal.	Opal.	Opal.	Limp.	Limp.	Limp.
Aspect ultérieur	Précip.	Précip.	Précip.	"	"	"
Mg ^{rs} extraits	3,6	4,7	17,5	64,5	64,0	66,0

Cheval n° 4 — 20^{me} de sérum à 6% d'alcool :

Durée d'extraction	1 h. 30	17 h.	26 h.	48 h.
Aspect immédiat après séparat.	Limp.	Opal.	Opal.	Limp.
Aspect ultérieur	Limp.	Opal.	Précip.	Limp.
Mg ^{rs} extraits	0,6	0,7	2,2	42,0

3. *Etude de la viscosité du sérum extrait par l'alcool et l'éther.* — L'augmentation de la viscosité du sérum indique un début de dénaturation des protéides sériques.

L'alcool seul, et jusqu'à 20 %, n'altère pas la limpidité du sérum, si ce n'est très légèrement au bout de plusieurs jours.

Aussi ce n'est guère qu'à partir de 12 à 14 % que les protéides subissent un commencement de dénaturation en présence d'alcool et d'éther :

Concentration en alcool.....	0 %	4 %	6%	8 %	12 %	20 %
Viscosité en durée d'écoulement.	15	15	17	17	20,5	29

Les protéides ne sont dénaturées que pour les fortes teneurs en alcool.

e) RAPPORT ALBUMINE SUR GLOBULINE AVANT ET APRÈS L'EXTRACTION ALCOOL-ÉTHÉRÉE.

Ce rapport n'est nullement changé dans les conditions optimales :

CHEVAL n° 2 (10 cmc. de sérum-10 % d'alcool). —
Durée de 5 heures.

	Avant l'extraction	Après l'extraction
Globulines	399	401
Albumines	269	270
Alb. / Glob.	0,67	0,67

Les lipides extraits n'interviennent donc pas dans les propriétés de solubilité des protéïdes. B. OHLSON et O. RUNDQUIST [49] arrivent à un résultat conforme à celui-ci.

Les lipides n'agiraient donc sur la solubilité des protéïdes que dans les fractions secondaires (complexe de Machebœuf ou fraction terminale des euglobulines).

f) RÉPARTITION DES GRAISSES EXTRAITES
DANS LES CONDITIONS OPTIMALES ENTRE ALBUMINES
ET GLOBULINES DU SÉRUM PRIMITIF.

Les lipides des albumines, comme ceux des globulines, subissent l'extraction, mais un peu moins que ces derniers. On extrait donc un ensemble lipidique complexe ayant à peu près la même constitution que les lipides totaux du sérum. Cette extraction est plus ou moins considérable suivant les sérums.

CHEVAL n° 2 (10 cmc. sérum, 10 % alcool pendant 5 h.) :

	Avant extraction	Après extraction	<u>Lipides extraits</u> <u>Lipides totaux</u>
Mg ^{rs} de lipides totaux du sérum	64,5	34,5	0,47
" " des albumines	37,5	23,0	0,39
" " " globulines	22,5	7,3	0,67

g) EXTRACTION ALCOOL-ÉTHÉRÉE
DU COMPLEXE DE MACHEBŒUF.

G. Sandor [47], après avoir fractionné un sérum suivant les indications de M. A. Machebœuf, a dissout une certaine quantité du complexe et l'a neutralisé pour le soumettre à une extraction alcool-éthérée à 10 % d'alcool pendant 24 heures. Il n'a réussi à extraire qu'un milligramme de graisses sur les 100 qui se trouvaient dans la solution, et encore ce milligramme de graisse s'y trouvait-il sans doute sous forme d'impureté.

G. Sandor soumit ensuite un autre échantillon du même sérum à l'extraction alcool-éthérée dans les mêmes conditions. Il dialysa ensuite sous pression le sérum, après la séparation des phases, contre une solution de sérum physiologique pour éliminer alcool et éther ; il neutralisa et fractionna pour obtenir le complexe de Machebœuf. Les albumines se précipitèrent comme d'habitude en présence de sulfate d'ammonium à pH 3,8, mais la dissolution du précipité dans l'eau distillée fut intégrale. Ces albumines ne contenaient donc plus le complexe de Machebœuf ou bien ce dernier avait été modifié par l'alcool-éther.

h) NATURE DES OPALESCENCES INEXTRACTIBLES
PAR L'ÉTHÉR.

Les cas traités ci-dessus se rapportent à des sérums typiques. Mais les cas atypiques ne sont pas

rare dans une même espèce : les courbes d'extractions sont irrégulières et les opalescences persistent après l'extraction, ou bien des émulsions stables se forment et montent à la surface de la phase hydro-alcoolique.

Ces sérums se comportent comme des sérums typiques aux concentrations élevées : diminution de l'extractibilité et formation d'opalescences persistantes. On constate la disparition quasi-totale des lécithides des graisses extraites.

La formation secondaire accidentelle d'émulsions inextractibles par l'éther rendrait compte à la fois des opalescences persistantes, de la diminution de l'extractibilité et de l'irrégularité des courbes d'extraction en fonction des concentrations alcooliques.

Résumé des résultats obtenus dans l'étude de l'extraction alcool-éthérée du sérum sanguin.

L'éther, en présence de petites quantités d'alcool, libère et extrait du sérum de 20 à 80 % et généralement environ 50 % des graisses qu'il contient.

La quantité de graisses extraites est indépendante dans de larges mesures des concentrations en alcool et du volume d'éther employés : elle semble être une constante caractéristique du sérum. L'extraction évolue dans le temps : après une phase préparatoire semblant dépendre des concentrations alcooliques, la période d'extraction active relativement très courte évolue toujours de la même façon

et aboutit toujours à la même limite pour un même sérum. Ce n'est que pour des concentrations alcooliques relativement élevées (au-dessus de 12 %) que des phénomènes secondaires troublent l'extraction. L'extraction alcool-éthérée ne modifie pas sensiblement les protéides sériques qui se retrouvent après l'extraction avec les mêmes teneurs que dans le sérum primitif. Les sérums qui se comportent irrégulièrement forment toujours des émulsions et des précipités.

C. — Nature des complexes lipoprotéidiques et protéidoprotéidiques.

Les caractères physico-chimiques des deux groupes de complexes se touchent en de nombreux points. Les faits constatés pour l'un aident à la compréhension de ceux constatés pour l'autre.

Les protéides sont formées de polypeptides unis entre eux et aux graisses par des liaisons peu ou mal connues pour former des systèmes plus complexes.

*Complexes
lipoprotéidiques*

Caractères physico-chimiques spéciaux des lipides du sérum : Solution homogène et très stable dans l'eau ; inextractibilité par l'éther seul ; précipitation avec des protéides en systèmes bien caractérisés comme le complexe de Machebœuf.

*Complexes
Protéido-
protéidiques*

Instabilité

Les constantes physiques, la constitution chimique des grandes fractions des protéides du sérum subissent des variations continuelles au cours des divers fractionnements. La naissance de fractions solubles au cours de la dialyse des euglobulines, les modifications que subissent les courbes de solubilité au cours des divers fractionnements des protéides, les changements complexes des poids moléculaires à la suite de changements souvent peu importants dans les conditions du milieu montrent que des unions assez labiles entre protéides élémentaires évoluent soit par des séparations, soit par des recombinaisons successives. Les diverses fractions des albumines et des globulines ont aussi des compositions chimiques différentes.

*Complexes
Protéido-
protéidiques
(Suite)*

Stabilité

La limite de précipitation nette obtenue par la méthode de Hofmeister, une différence sensible entre des points isoélectriques moyens, une différence sensible entre les pouvoirs rotatoires séparant globulines et albumines, donnent ainsi un caractère chimique à ces complexes. La même constance caractérise les fractions lipidiques des albumines et des globulines.

Ces systèmes peuvent évoluer dans certaines circonstances d'une façon discontinue : SVEDBERG et SJOERGEN [50], en étudiant le poids moléculaire des protéides par ultracentrifugation ont observé que le poids moléculaire des albumines reste constant entre des pH allant de 4 à 9 et qu'il semblait subir un fractionnement discontinu au-dessous et au-dessus de ces limites.

**D. — Nature des forces intervenant
dans la constitution du système lipoprotéidique.**

**a) CARACTÈRES PHYSIQUES
DES COLLOIDES BIOLOGIQUES.**

La plupart des colloïdes artificiels et tous les colloïdes minéraux présentent des différences fondamentales avec les colloïdes de la matière vivante, protéides et polyholosides. Seuls ces derniers demandent de très fortes concentrations en électrolytes pour être précipités à partir de leurs solutions aqueuses, comme l'a montré J. LÆB [51]. De ces travaux, il ressort que la stabilité de leurs solutions aqueuses et leurs réactions vis-à-vis des acides et des bases rapprochent les protéides plutôt des cristalloïdes que des colloïdes.

Mais les protéides forment avec une grande facilité des gels et s'entraînent aisément mutuellement dans des complexes plus ou moins stables. J. LÆB en donne une explication intéressante :

Les groupements acide, amine, amide, à la surface de la molécule de protéide en solution aqueuse, sont en dissolution vraie ; par contre les fonctions carbures d'hydrogène ont une tendance à se lier entre elles. Les gels de protéides seraient donc constitués par une dissolution mutuelle des fonctions carbures d'hydrogène et une dissolution aqueuse partielle de ces molécules par leurs groupements polaires acide, amine et amide.

b) THÉORIES PHYSICO-CHIMIQUES

SE RAPPORTANT A LA STRUCTURE DES PROTÉIDES.

1. *La Micelle de* NÆGELI [52] était supposée constituée par un agrégat microcristallin de plusieurs molécules et aurait constitué la plus petite particule intervenant dans la constitution de la matière vivante. Naegeli avait observé la biréfringence et l'anisotropie de nombreux produits d'origine biologique, et il en concluait que le plus petit constituant de la matière vivante, sa micelle, était un élément cristallin composé de plusieurs espèces chimiques différentes. Mais le collagène, de structure cristalline, par chauffage devient gélatine sans structure cristalline. Cette structure microcristalline du collagène ou de la gélatine sous tension serait en faux équilibre. Aussi l'anisotropie, la biréfringence et l'existence de spectres des rayons X seraient l'exception pour les gels de protéides naturels dont les micelles auraient, grâce à des réunions irrégulières, une structure en réseau.

2. *Hypothèse de* K. H. MEYER [53]. — D'après cet auteur, l'unité de constitution serait une micelle spéciale : les différentes molécules linéaires, polypeptides et lipides, seraient réunies entre elles par des forces de cohésion. L'agencement irrégulier des constituants moléculaires et la flexibilité des chaînes de polypeptides caractériseraient ces micelles, d'où

absence d'éléments cristallins. Les micelles de K. H. Meyer ne seraient donc pas des unités rigides.

3. *Conception de SÆRENSEN* [54]. — Plusieurs polypeptides différents, réunis par des forces de valence primaire seraient groupés en polymères qui seraient réunis par des forces de valence secondaire et formeraient un système très labile à modifications réversibles. L'auteur ne précise pas si ces forces de valence primaire et secondaire sont des forces de cohésion ou des forces chimiques. Les lipides seraient unis aux polypeptides par des forces de valence secondaire.

4. *Les Théories de K. H. Meyer et de Sørensen* sont très proches, des micelles lâches, irrégulières, donnant des complexes labiles, dissociables, réversibles. La théorie de Naegeli montre des micelles donnant des complexes rigides, cristallins, stables, à changements discontinus et irréversibles.

Les conclusions de Naegeli s'accordent le mieux avec les résultats obtenus dans l'extraction alcoolo-éthérée du sérum.

c) RÉSULTATS OBTENUS

PAR L'EXTRACTION ALCOOLO-ÉTHÉRÉE DU SÉRUM.

1. — L'étude de l'extraction alcoolo-éthérée du sérum en un temps donné de six heures a permis de tracer la courbe représentative des variations de la

quantité de lipides extraits en fonction de la concentration alcoolique.

Si la concentration alcoolique est inférieure à 6 % l'éther n'extrait pas ou guère de lipides. Si la concentration dépasse une certaine valeur (celle du seuil d'extraction) la quantité de lipides extraits s'élève brusquement, puis reste constante lorsque croît la concentration en alcool. La discontinuité est très nette.

Pour chaque concentration en alcool, l'extraction se fait en fonction du temps d'une façon comparable, mais avec des vitesses différentes.

L'éther n'extrait les lipides que très lentement pendant un temps préparatoire assez long. La vitesse de l'extraction croît brusquement pendant la période active qui suit et l'extraction atteint sa limite en un temps très court. Cette limite est indépendante de la concentration en alcool ; enfin l'éther n'extrait presque plus rien pendant la période qui suit.

Dans cette étude de l'extraction en six heures, le seuil d'extraction brusque constaté correspond à la concentration alcoolique pour laquelle six heures suffisent pour que la période préparatoire à l'extraction soit terminée.

2. *Discussion.* — La courbe ressemble à la courbe représentative d'un phénomène d'autocatalyse : les quelques molécules de graisses extraites pendant la période préparatoire troubleraient un

équilibre et provoqueraient l'extraction ; la courbe est la même pour les différentes concentrations en alcool dans la période active d'extraction ; cette extraction, qui ne dépend pas de la teneur en alcool, évolue, une fois déclenchée, indépendamment des conditions extérieures.

Sous l'effet combiné de l'alcool et de l'éther, l'extraction lente de faibles quantités de graisses a amené un déséquilibre dans la constitution du système lipoprotéidique et a provoqué le déclenchement de l'extraction rapide d'une proportion notable de lipides du sérum.

La représentation physique de ce phénomène rend bien compte des faits observés :

le système lipoprotéidique du sérum serait un système micellaire dont l'orientation moléculaire condenserait à la surface micellaire les fonctions polaires hydrophiles et à l'intérieur de la micelle les fonctions apolaires hydrophobes et paraffines ;

l'éther serait un solvant des fonctions paraffines cachées à lui dans l'intérieur des micelles et n'aurait aucune action sur les fonctions polaires qui seraient en contact avec lui. Pendant la phase préparatoire à l'extraction, l'extraction lente de quelques molécules lipidiques, véritables piliers de la construction des micelles, en présence d'éther et d'alcool, par diminution de l'hydratation des micelles amènerait la dépolarisation brusque des molécules, et les fonctions cachées de l'intérieur des micelles seraient ainsi

rendues accessibles à l'éther, au moins partiellement.

L'étude de l'extraction alcoolo-éthérée du sérum donne donc l'idée de l'existence d'un système lipoprotéidique stable, équilibré du sérum.

d) HYPOTHÈSE DE SANDOR

SUR LA STRUCTURE DES MICELLES LIPOPROTÉIDIQUES

Les constituants des micelles lipoprotéidiques ont une orientation spéciale lorsque les micelles sont en dispersion aqueuse : les particules ont une constitution particulière due à l'orientation des molécules par les chaînes de valence primaire. Les groupements polaires s'orientent vers les molécules d'eau, stabilisant ainsi le système, et les groupements hydrophobes des carbures d'hydrogène se réunissent dans les micelles ; des atmosphères spéciales d'eau de plus grande densité et de protéides, par effet électrostatique des groupements ionisés carboxyle et amine, entourent la surface micellaire et augmentent sa stabilité. Des forces de valence secondaire unissent entre eux et aux molécules de lipides les polypeptides à l'intérieur des micelles.

Les micelles ont un équilibre physique particulier amenant une rigidité de constitution proche d'une structure cristalline : des polypeptides et des lipides de valence primaire, à configuration moléculaire permettant une correspondance géométrique, forment un pseudo-cristal.

CHAPITRE TROISIÈME

Extractibilité des lipides sériques par l'éther en présence d'alcool à froid, en relation avec l'état de santé ou de maladie.

Comme nous l'avons vu, l'étude de l'extraction des lipides du sérum sanguin d'animaux sains par l'alcool-éther a été faite par Machebœuf et Sandor.

L'étude de cette extraction pour les sérums sanguins d'animaux malades a été entreprise par plusieurs auteurs et les premiers résultats obtenus semblent concorder :

A. — Travaux de Bernard Delage.

BERNARD DELAGE [55] a étudié le comportement des lipides du sérum de génisses vaccinières de l'Institut Pasteur du Maroc en présence d'alcool-éther à froid. La rapidité et la brutalité de l'infection chez ces animaux étaient propices à l'étude entreprise.

Il fit à chaque génisse utilisée une première prise de sang immédiatement avant l'inoculation de virus

vaccinal, une deuxième le jour de la récolte du vaccin soit environ cinq jours après la première, et une troisième avant la mort de l'animal, quand celui-ci succombait à l'infection. Bernard Delage constata que les lipides extractibles à froid par l'alcool-éther disparaissaient lorsque l'animal était prêt de succomber à l'injection : l'éther n'extrayait guère plus de graisses en présence d'alcool qu'il ne l'eut fait tout seul.

Le tableau ci-après montre bien la modification de la courbe d'extraction des lipides amenée par l'infection :

Génisse n°23 — Prises de sang						
n°1 — Avant l'inoculation						
n°2 — Le jour de la récolte de la vaccine						
n°3 — Deux jours après la récolte, quelques heures avant la mort						
Pour 25 ^{me} de sérum et pour un contact de 15 heures, extraction en M ^{grs} de graisses:						
% d'alcool	4	8	12	16	20	24
n°1	2,9	3,8	17,6	19,5	11,0	13,0
n°2	4,0	4,4	22,5	20,3	9,6	12,0
n°3	2,3	1,9	2,2	3,0	2,3	2,7

Le plateau de la courbe d'extraction obtenu vers 12 et 16 % d'alcool pour le sérum des prises de sang n°s 1 et 2 ne se retrouve plus pour le sérum de la prise de sang n° 3 qui précède la mort.

B. — Recherches de Goret et Sandor [56].

P. Goret et G. Sandor ont constaté que la courbe d'extraction des lipides du sérum sanguin de cheval

atteint d'anémie infectieuse était fort différente, dans les cas qu'ils ont étudié, de la courbe obtenue pour le sérum sanguin de chevaux sains par G. Sandor et Machebœuf.

Dans l'une de leurs expériences, ils ont obtenu les résultats suivants, en milligrammes de graisse, pour 20 cmc. de sérum soumis pendant environ 17 heures à l'extraction par 20 cmc. d'éther et des quantités variables d'alcool.

Pourcentage d'alcool	6	8	10	12	14
Sérum de cheval anémique	4,6	4,4	4,4	9,2	9,4
" " normal (57)	3,2	74,7	74,0	75,0	25,3

Comme dans les cas étudiés par B. Delage, on voit ici aussi la disparition du plateau de la courbe pour les concentrations en alcool de 8, 10 et 12 %.

Pour les cas de chevaux atteints d'anémie infectieuse il y aurait donc une diminution de l'extractibilité des lipides du sérum et l'extraction des graisses débiterait à une concentration plus élevée que pour le sérum normal.

C'est la constatation de ce fait expérimental qui nous a conduit à rechercher s'il était constant pour l'extraction des graisses du sérum de cheval atteint d'anémie infectieuse, et à vérifier s'il ne se rencontrait pas aussi pour des sérums de chevaux atteints de tout autre maladie.

CHAPITRE QUATRIÈME

Recherches personnelles.

A. — Technique utilisée pour les extractions de Lipides.

Dans cinq boules à décantation nous avons, en renversant lentement et régulièrement ces dernières, mélangé 10 cmc. du sérum étudié à un volume égal d'éther et à des quantités variables d'alcool à 96°,

à savoir :

0 cmc. 6	0 cmc. 8	1 cmc.	1 cmc. 2	1 cmc. 4.
soit :				
6 %	8 %	10 %	12 %	14 %
du volume de sérum étudié.				

Nous avons laissé l'extraction des lipides du sérum par l'éther, en présence d'alcool, se faire pendant 17 heures. Nous avons ensuite décanté la phase aqueuse, filtré, puis évaporé l'éther dans des fioles de Fourneau tarées et pesé les résidus.

Nous avons opéré successivement l'extraction des lipides du sérum sanguin de chevaux sains et normaux ; de chevaux vieux, mais sains ; de chevaux

atteints d'anémie infectieuse ; d'autres chevaux suspects seulement d'anémie infectieuse ; d'une jument guérie cliniquement depuis six mois d'anémie infectieuse ; d'un cheval vacciné ayant résisté à une dose infectante de virus de l'anémie infectieuse.

Nous avons aussi opéré l'extraction alcoolo-éthérée des graisses du sérum de chevaux gourmeux, de chevaux hyperimmunisés (anatoxine tétanique), le comportement à l'égard de l'éther-alcool des graisses chargées d'antigène pouvant être modifié, de chevaux fébricitants, la fièvre modifiant les colloïdes du sérum sanguin. Le sérum de chevaux fiévreux a été pris sur des chevaux immunisés à la toxine tétanique encore sous l'influence du choc occasionné par l'inoculation d'une forte dose d'anatoxine.

**B. — Tableau des chiffres de l'extraction
en milligrammes de graisses.**

Le tableau ci-après indique en milligrammes les quantités de graisses extraites pour 10 cmc. de chaque sérum étudié et pour les concentrations en alcool allant de 6 à 14 % du volume du sérum.

Pourcentage d'alcool:		6%	8%	10%	12%	14%
Chevaux normaux.	N° de serum					
	V	1,8	20,4	8,8	21,2	12,5
	X		9,4	16,9	27,5	11,6
	XI	3,7	3,9	12,5	16,9	19,7
	XXVI	3,8	1,7	12,9	13,8	7,0
Chevaux Normaux Vieux.	VI	1,8	6,1	5,0	10,1	7,1
	VII	1,8	1,3	9,6	5,6	9,4
Cheval guéri chimiquement d'anémie infectieuse depuis 6 mois	VIII	2,9	8,0	13,0	19,3	
Cheval vacciné ayant résisté à dose infectante de virus d'aném. infect.	IX	2,4		4,5	4,5	8,7
Chevaux suspects d'anémie infectieuse	I	0,1	1,6		2,2	
	XXXIII		2,7	2,2	6,5	10,1
	XXXIV	0,9	1,2	1,0	6,8	4,1
	XXIII		21,6	40,6	25,2	6,0
Chevaux atteints d'anémie infectieuse.	II	4,8	12,7	16,6	7,7	
	III	3,1	14,4	13,0	8,5	
	IV	2,8	3,2	10,1	3,6	
	XVIII		31,8	36,3	46,6	47,0

Pourcentage d'alcool:		6%	8%	10%	12%	14%
<u>Chevaux</u>	<u>N° de</u>					
<u>Hyperimmunisés</u>	<u>serum</u>					
(Anatoxine té-	XIV	1,1	1,4	4,1	5,5	11,3
tanique) -	XXII		5,0	5,8	6,9	3,8
	XXIV	1,2	2,2	5,9	14,7	12,2
	XX	2,9	3,9	18,8	32,3	20,2
	XXI	2,0	6,3	28,8	20,6	25,3
	XXV	3,9	2,5	26,3	25,6	19,8
	XII	4,2	21,9	24,7	20,2	23,8
	XIII	2,4	22,1	26,2	21,5	
	XVII	2,5	3,3	2,6	11,5	16,4
	XIX	2,1	2,5	14,0	29,1	25,2

<u>Chevaux fié-</u>						
<u>vreux inoc.</u>						
<u>Steppe-gourme</u>						
3989	XV	3,0	7,8	17,2	21,8	9,3
398	XVI	0,8	6,9	7,9	8,2	7,9
<u>Inoc. Anatoxine</u>						
<u>tétanique</u>						
3987	XXVIII	3,6	4,0	14,6	16,2	12,0
3888	XXXII	2,8	23,4	19,4	24,6	23,9
3983	XXXI (XII)	1,1	13,5	22,8	17,6	21,9
3981	XXVII (XIII)	2,6	16,7	19,4	19,6	20,9
398	XXX (XVII)	2,7	3,9	17,1	18,1	21,3
3889	XXIX (XIX)	1,8	3,1	16,1	20,7	22,2

C. — Courbes d'extractibilité moyenne pour chaque catégorie de sérum étudiée.

Les chiffres traduisant l'extractibilité moyenne ont été obtenus en opérant d'abord une simple règle de trois, ramenant les chiffres à un simple pourcentage par rapport au plus fort d'entre eux pour chaque sérum, puis en faisant la moyenne de ces pourcentages pour chaque concentration en alcool dans chaque catégorie de sérum.

Exemple :

SÉRUM V. — Le chiffre d'extraction 21,2 étant le plus fort, et 1,8 étant celui obtenu pour 6 % d'alcool, on a :

$$\begin{array}{rcl} 21,2 & 100 & \\ 1 & \frac{100}{21,2} & \\ 1,8 & \frac{100 \times 1,8}{21,2} = 8,49. & \end{array}$$

Les chiffres ainsi obtenus pour la concentration de 6 % d'alcool étant les suivants pour les différents sérums :

$$8,49 - 18,7 - 27,5$$

on obtient la moyenne de 18,2 qui est le chiffre d'extractibilité moyenne à 6 % d'alcool pour les sérums de chevaux normaux.

On opère de même pour les différents taux d'alcool et on obtient le tableau suivant pour les diverses catégories de sérums étudiés :

Pourcentage d'alcool	6	8	10	12	14
Chevaux normaux	18,2	40,5	64,9	96,4	62,9
" " fiévreux	18,2	37,1	74,9	79,1	84,6
" suspects d'anémie infectieuse	8,8	32,5	45,4	75,4	58,5
" atteints d'anémie infectieuse	26,0	68,8	91,8	55,0	
" hyperimmunisés (anatoxine tétanique)	9,7	33,6	68,2	85,1	82,9
" en état d'hyperthermie	11,8	51,3	86,1	93,6	88,2
XII, XIII, XVII, XIX (numéros de sérums)	12,1	50,3	65,9	83,4	94,2
XXVI, XXVII, XXX, XXIX	9,4	42,8	86,3	87,3	99,0

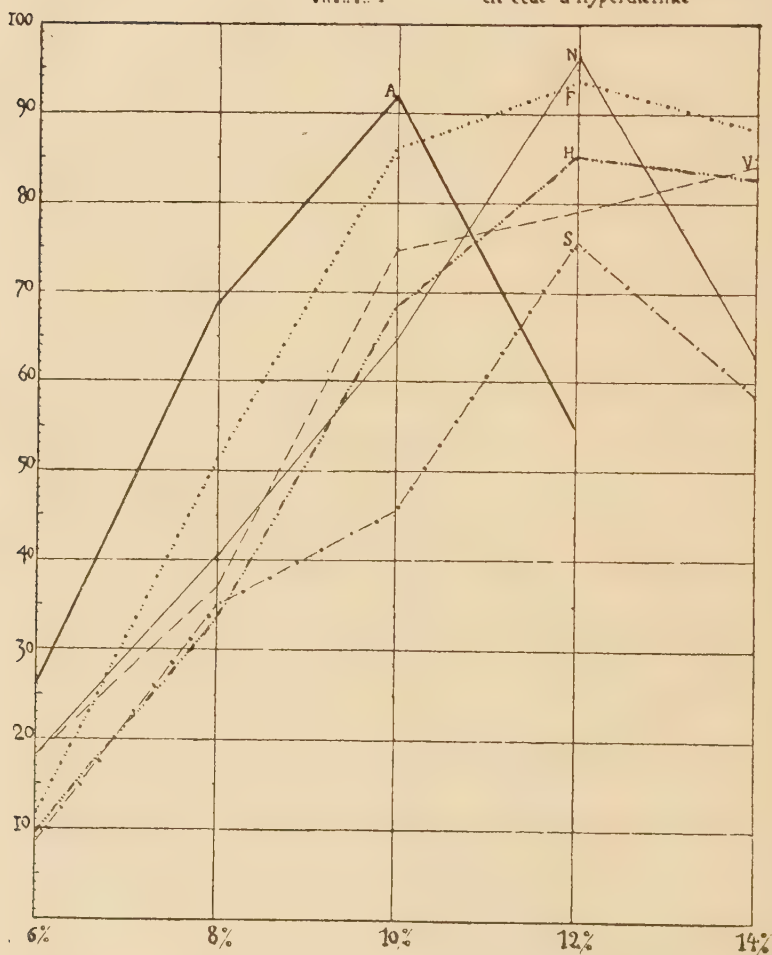
Etude des courbes d'extractibilité moyenne : Des concentrations de 6 à celles de 10 %, l'extractibilité augmente assez régulièrement pour tous les sérums.

A partir de 10 % seule l'extractibilité du sérum d'anémique baisse, d'ailleurs très nettement. Toutes les autres courbes d'extractibilité montrent une augmentation de 10 à 12 %, et seule celle des sérums de vieux chevaux continue cette augmentation, d'ailleurs très faible depuis 10 % jusqu'à 14 %. Les courbes d'extractibilité des sérums de suspects d'anémie infectieuse, de normaux, d'hyperimmunisés et de fiévreux s'abaissent à partir de 12 % et d'autant plus brusquement qu'elles sont montées rapidement entre 10° et 12° (sérums de suspects et surtout de normaux).

Il n'y a donc de vraiment caractéristique que la courbe d'extractibilité des sérums de chevaux ané-

COURBES D'EXTRACTIBILITE MOYENNE

— N Chevaux normaux
 — V " " vieux
 -.- S " suspects d'anémie infectieuse
 — A " atteints " "
 — H " hyperimmunisés (apatoxine tétanique)
 F " en état d'hyperthermie



miques, avec chute très nette à partir de 10 % d'alcool. Cette différenciation du comportement des sérums d'anémiques à l'égard de l'alcool-éther se retrouvera dans l'étude du tableau de l'extraction absolue maxima.

L'étude comparative des courbes du groupe de sérums XII, XIII, XVII et XIX et du groupe de sérums XXXI, XXVII, XXX et XXIX chez quatre mêmes chevaux permet de constater que le premier groupe suit bien jusqu'à 12 % la courbe d'extractibilité des sérums des chevaux hyperimmunisés, que le second groupe suit sensiblement la généralité des sérums de chevaux en hyperthermie et que le relèvement sensible de l'extractibilité entre 12 et 14 % persiste de la même façon dans les deux groupes de sérums et est caractéristique de ce groupe de 4 chevaux.

D. — **Extraction absolue maxima.**

Sauf pour les sérums de vieux chevaux dont l'extractibilité moyenne continue d'augmenter après la concentration alcoolique de 12 %, les sommets des courbes d'extractibilité moyenne de tous les sérums se trouvent, soit à 10 %, soit à 12 % d'alcool. Pour contrôler les résultats obtenus par l'étude de ces courbes et pour les compléter, il suffira d'établir les moyennes d'extraction des différents groupes de sérums aux deux concentrations indiquées, 10 et 12 %, moyennes donnant le tableau d'extraction absolue maxima suivant :

Concentration en alcool	10%	12%	Extraction moyenne à 10% " " à 12%
Chevaux normaux	12,77	19,85	0,84
IV suspects d'anémie infectieuse	14,60	12,85	1,13
VI atteints " "	19,00	16,00	1,11
VI hyperimmunisés (anémie tétanique)	15,70	18,79	0,84
" en état d'hyperthermie	16,80	18,30	0,91
Sérums XII, XIII, XVII, XIX.	16,87	20,57	0,82
" XXXI, XXVII, XXX, XXIX.	18,85	19,00	0,99

L'extraction absolue maxima n'est donc obtenue à 10 % que pour les seuls sérums d'animaux suspects et atteints d'anémie infectieuse. On rend mieux compte de ce fait en rapportant les extractions moyennes obtenues pour 10 % d'alcool à celles obtenues pour 12 %.

Au point de vue de l'extraction absolue maxima, les sérums de suspects d'anémie infectieuse s'identifient donc à ceux des chevaux reconnus anémiques autorisant ainsi peut-être leur classement dans le groupe des animaux infectés par le virus de l'anémie infectieuse pour les cas étudiés ici. De la même façon, le cheval VIII, classé comme guéri cliniquement de l'anémie infectieuse, rentre dans le groupe des chevaux normaux par le rapport de 0,67 qui unit les chiffres de ses extractions à 10 et 12 %.

Nous serions ainsi amenés à faire de la concordance de ces chiffres, qui sont des moyennes, avec

ceux des sérums individuels un critère servant au diagnostic d'anémie infectieuse si le tableau des extractions ne nous révélait des exceptions à cette règle :

les chevaux XXI, XXV XII, XIII seraient anémiques et le cheval XVIII, reconnu pourtant pour tel, ne le serait pas. Mais comme ce rapport ne saurait servir qu'à assurer un diagnostic hésitant, les chevaux XXI, XXV, XII, XIII n'auraient, s'il était utilisé, pas risqué d'être pris pour des chevaux atteints d'anémie infectieuse tandis que le cheval XVIII n'aurait pas été soumis à une extraction de lipides puisque déjà reconnu sûrement infecté.

Le rapport effectué pour les extractions obtenues à partir du sérum des chevaux XII, XIII, XVII et XIX, et des sérums pris sur les mêmes chevaux en hyperthermie et numérotés XXXI, XXVII, XXX et XXIX nous montre des chiffres fort proches de ceux obtenus pour les hyperimmunisés et les fiévreux en général.

Conclusions.

1^o L'extractibilité moyenne du sérum de cheval atteint d'anémie infectieuse est à son maximum à 10 % d'alcool, tandis que pour tous les autres sérums ce maximum n'est atteint qu'à 12 % et parfois 14 % de concentration alcoolique.

2^o L'état d'hyperthermie ne modifie pas sensiblement l'allure de la courbe d'extractibilité d'un sérum.

3^o L'extraction absolue maxima n'est obtenue à 10 % de concentration alcoolique qu'avec les sérums de chevaux atteints d'anémie infectieuse ou qui en sont suspects ; la recherche de cette extraction absolue maxima ne pourra donc avoir qu'une valeur de confirmation de diagnostic pour des chevaux soupçonnés d'être infectés par le virus de l'anémie infectieuse à cause de signes cliniques suspects.

4^o Le rapport : $\frac{\text{extraction moyenne à 10 \%}}{\text{extraction moyenne à 12 \%}}$ semble suivre assez fidèlement l'état de santé ou de

maladie, faible pour le premier état (environ 0,64 par exemple), plus fort en hyperthermie (0,91, 0,99) et plus encore pendant l'infection par le virus d'anémie infectieuse (1,14).

Vu : le Président de la thèse,

N. FIESSINGER.

Vu : le Doyen,
ROUSSY.

Vu et permis d'imprimer :
Le Recteur de l'Académie de Paris,
S. CHARLÉTY.

BIBLIOGRAPHIE

1. *Panum*. — *Virchow, Arch.* 3, I, 251 (1851).
2. *Schmidt (Alex)*. — *Reichters u. Du Bois-Reymonds Archiv.* (1862).
3. *Hammarsten (O.)*. — *Ergebnisse der Physiologie*, 1, 330 (1902).
4. *Hofmeister (Fr.)*. — *Arch. f. Exp. Path. u. Pharm.*, 24 à 28 (1888 à 1890).
5. *Kauder*. — *Arch. f. Exp. Path. u. Pharm.*, 20, 411 (1866).
6. *Emil (Marcus)*. — *Zeitschr. f. Physiol. Chemie*, 28, 559 (1899).
7. *Seng (W.)*. — *Zeitschr. f. Hyg. u. Infekt.*, 31, 513 (1899).
8. *Guerber*. — *Sitzungsbericht d. Wuezburger med. Ges.* (1894).
9. *Robertson*. — *Journal o. Biol. Chemistry*, 13, 325 (1913).
10. *Halliburton*. — *Journal of Physiology*, 7, 319 (1886).
11. *Oppenheimer*. — *Verh. d. Berl. Physiol. Ges.* (1902).
12. *Hougaridy*. — *Chem. Zentralblatt*, 2, 682 (1900).
13. *Hammarsten (O.)*. — *Lehrbuch der physiol. Chemie*. édit. Bergmann (München, 1926).
14. *Obermayer (F.) et Wilhelm (R.)*. — *Biochem. Zeitschr.*, 38, 331 (1912) et 50, 369 (1913).
15. *Porges et Spiro*. — *Beitr. z. Chem. Physiol. u. Path.*, 3, 277 (1903).
16. *Groh (J.) et Faltin (E.)*. — *Zeitschr. f. Physiol. Chemie*, 190, 13 (1931).

17. *Goldschmidt et Kahn.* — Zeitschr. f. Physiol. Chemie, 183, 19 (1920).
18. *Soerensen (S. P. L.).* — C. R. du Labbratoire Carlsberg, vol. 12 (1917).
19. — C. R. du Laboratoire Carlsberg, vol. 15, n° 11 (1923) et *Jowen Amer. Chem. Soc.*, 47, 457 (1925).
20. *Hardy (W. B.) et Mellanby.* — Jour. f. Physiol., 33, 251 et 33, 338 (1905).
21. *Chick (H.).* — The Biochem. Jour., 8, 261 et 404 (1914).
22. *The Svedberg.* — Journ. Amer. Chem. Soc., 48 (1926) et 52 (1930) ; Kolloidzeitschr., 36 b, 53 (1925) ; Zeitschr., f. Physik. Chem., 121, 65 (1926) et 127, 51 (1927).
23. *Lepeschkin (W. W.).* — Arch. f. Exper. Zellforschung, 4, 212 (1927) et Biochem. Zeitschr., 171, 126 (1926).
24. *Lumière (Au).* — Revue générale des colloïdes, 3, 8 (1925).
25. *Hoppe-Seyler.* — Med. Chem. Untersuchungen. Berlin, 1866.
26. *Erlandsen.* — Zeitschr. f. physiol. Chem., 51, 71 (1907).
27. *Liebermann.* — Archiv. f. die ges. Physiol., 50, 25 et 55 (1891) et 54, 573 (1893).
28. *Langmuir.* — Journ. Amer. Chem. Soc., 39, 1848 (1917).
29. *Harkins (W. D.) Brown (F. E. H.) et Davies (E. C.).* — Journ. Amer. Chem. Soc., 39, 354 (1917) et *Harkins (W. D.), Davies (E. C. H.) et Clark (G. L.)* Journ. Amer. Chem. Soc., 39, 541 (1917).
30. *Degkwitz (R.).* — Ergebnisse der Physiol., 32, 821 (1931).
31. *Seifritz.* — Amer. Journ. Physiol., 66, 124 (1923).
32. *Harkins et Humphrey.* — Journ. Amer. Chem. Soc., 38, 242 (1916).
33. *Spranger, Fernbacher et Degkwitz (R.).* — Ergebnisse d. Physiol., 32, 821 (1931).
34. *Bancroft.* — Journ. of Physiol. Chem., 17, Sol (1903) et 19, 275, 513 (1915).

35. *Hansteen (B.), Cranner.* — Ber. d. Deutschen bot. Ges., 37, 380 (1919).
36. *Graff (V.).* — Biochemische Zeitschr., 159, 144 (1925).
37. *Hoppe (F.), Seyler et Aronheim.* — Med. Chem. Untersuchungen. Berlin, 1866.
38. *Haslam (H.-C.).* — The Biochemical. Journ., 7, 492 (1913).
39. *Handowsky et Wagner.* — Biochemische Zeitschr., 31, 32 (1911).
40. *Theorell et Hugo.* — Biochemische Zeitschr., 175, 397 (1926).
41. *Trænsegaard et Koudahl.* — Zeitschr. f. Physiol. Chemie, 153, 111 (1926).
42. *Gardner (J. A.) et Gainsborough (H.).* — The Biochemical Jour., 21, 130 (1927).
43. *Hardy (W. B.) et Gardiner (Mme S.).* — Journ. of Physiol., 40 (1910); Proc. Physiol. Soc. LXVIII.
44. *Machebœuf (M. A.).* — Recherches sur les lipides, les stérols et les protéides du sérum et du plasma sanguin. Thèse de doctorat ès Sciences. Paris, 1928.
45. *Machebœuf (M. A.), Wahl (R.) et Sandor (G.).* — Bull. Soc. Chim. Biol., 13, 504 (1931).
46. — Bull. Soc. Chim. Biol., 13, 736 (1931).
47. — *Sandor (G.).* — Contribution au problème des protéides. Thèse de doctorat ès Sciences. Paris, 1933.
48. *Machebœuf (M. A.) et Sandor (G.).* — C. R. Acad. Sciences 194, 1102 (1932) et Bull. Soc. Chim. Biol., 14, 1168 (1932).
49. *Ohlson (B.) et Rundquist (O.).* — Biochemische Zeitschr., 247, 249 (1932).
50. *The Svedberg et Sjoergen (B.).* — Journ. Amer. Chem. Soc., 52, 2855 (1930).
51. — *Loeb (J.).* — Les protéines, édit. F. Alcan, Paris, 1924.
52. *Naegeli (C. V.).* — Staerkekörner. München, 1858.

53. *Meyer (K. H.)*. — Biochem. Zeitschr., 214, 253 (1929).
54. *Soerensen (S. P. L.)*. — C. R. du laboratoire Carlsbreg, vol. 18, n° 5 (1930).
55. *Delage (Bernard)*. — Contribution à l'étude de la stabilité des liaisons lipoprotéiques du sérum sanguin. Annales Institut Pasteur du Maroc.
56. *Goret (P.) et Sandor (G.)*. — Etude du système lipo-protéique du sérum des chevaux atteints d'anémie infectieuse. Bull. Acad. Vét. France (1934).
57. *Machebœuf (M. A.) et Sandor (G.)*. — Bull. Soc. Chim. Biol., 14.
-

1408. — Impr. de la Fac. de Méd. Jouve et Cie, 15, rue Racine, Paris. — 6-35
